

Vliv mineralizace vzorku na citlivost řasového biotestu

The influence of sample mineralization on algal bioassay sensitivity

Vladimír K o č í¹, Hynek B e n e š¹ & Petr H a š l e r²

¹ *Institute of Chemical Technology in Prague, Department of Environmental Chemistry, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.*

² *Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc-Holice*

Abstract

The effect of variable salinity on toxicity response of planktonic green alga-*Scenedesmus subspicatus* to heavy metals (especially on chrom VI) exposition was determined. *Scenedesmus subspicatus* was cultivated in suspension culture based on ISO guideline and salinity gradient was arranged by anorganic salt mixture. Salt mixture was based on composition of marine water. The algae were grown at salinity 0.006 mol.l⁻¹, 0.031 mol.l⁻¹, 0.056 mol.l⁻¹, 0.082 mol.l⁻¹ and 0.107 mol.l⁻¹. At all chosen salinity levels a dose-response curves of *S. subspicatus* exposed to K₂Cr₂O₇ were determined. The results demonstrated an important decrease of sensitivity of algal biomass at salinity level 0.031 mol.l⁻¹. At this salinity the presence of K₂Cr₂O₇ did not inhibit growth of algae, even at higher concentrations. Chelates of Cr₂O₇ anion are not expected because the chelation processes are common with Cr³⁺ ion.

Úvod

Článek se zabývá otázkou, jak zvýšená mineralizace matrice vzorku může ovlivnit toxicitu Cr(VI) vůči testovacímu organismu, sladkovodní chlorokokální řase *Scenedesmus subspicatus*. Důvodem je, že při zpracování některých vzorků s vysokým obsahem solí (např. ze skládek) je nutno odlišit nepříznivý účinek vysoké salinity od toxických účinků látek přítomných ve stopových koncentracích.

Toxicita těžkých kovů není ovlivněna pouze na koncentraci kovu, ale i formou jeho výskytu, která závisí na mnoha fyzikálních a chemických faktorech. Mezi nimi hraje významnou roli výskyt anorganických ligandů. Komplexy kovů jsou zpravidla méně toxické než jednoduché ionty (PITTER 1990). Velmi stabilní a aktivní anorganický komplexující ligand je chloridový iont, který se vyskytuje hlavně v mořské vodě, ale také v kontaminované sladké vodě (splašková

odpadní voda s vysokou mineralizací). Z toxikologického hlediska je velmi důležité rozpoznat dostupnost těžkých kovů pro různé druhy vodních organismů v přítomnosti chloridových iontů (LATALA & SUROSZ 1998). Lze předpokládat, že salinita prostředí významně pozměňuje toxicitu kovů. O vlivu salinity na toxicitu těžkých kovů vůči vodním organismům, zvláště řasám, je přesto doposud poměrně málo informací. Byl studován kombinovaný toxický vliv salinity a těžkých kovů vůči čtyřem druhům planktonních řas (*Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina*, *Scenedesmus armatus* a *Stichococcus bacillaris*) (LATALA & SUROSZ 1998). Autoři tohoto článku prováděli s jednotlivými druhy řas testy toxicity na vzorcích o různé koncentraci jednotlivých těžkých kovů (Zn, Cd, Co, Cu, Mn, Ni a Pb) a o různém stupni salinity (0-32‰). V případě Cd, Co, Cu a Mn byla zjištěna snižující se hustota řasových buněk se stoupající koncentrací kovu bez ohledu na salinitu vzorku. Ovšem snížený růst řasových buněk vyvolaný zvyšující se koncentrací Ni a Zn byl zřetelně umocněn rostoucí salinitou. Tato odezva byla zjištěna u všech druhů řas kromě *Oocystis submarina*. V případě Pb zvyšující salinita vzorku způsobila vzrůst toxického efektu kovu na řasu *Scenedesmus armatus* a *Oocystis submarina* (LATALA & SUROSZ 1998).

Sladkovodní řasa *Scenedesmus subspicatus* je adaptována na poměrně nízkou koncentraci solí, která vyjádřena jako konduktivita, se pohybuje v přirozených vodách v rozmezí hodnot od stovek až asi do 3000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (KALINA, ústní sdělení). Při provádění ekotoxikologického hodnocení silně mineralizovaného vzorku (např. vodného výluhu průmyslového odpadu) může reagovat sladkovodní řasa již na přítomnost relativně „netoxických“ solí stresovým chováním z osmotických důvodů (MOHAPATRA et al. 1998). Pokud tento vzorek navíc obsahuje „skutečně“ toxické látky nemusí být jejich toxický účinek na testovací organismus vůbec zaznamenán.

Cílem práce je zhodnotit použitelnost sladkovodní řasy *Scenedesmus subspicatus* pro ekotoxikologické hodnocení mineralizovaných vzorků.

Metodika a testované látky

Řasové testy byly prováděny na řase *Scenedesmus subspicatus* (BRINKMANN 1953/SAG 86.81) získaného ze sbírky autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR v Třeboni.

Pro kultivaci a testování řas bylo použito médium doporučené technickou oborovou normou MZe ČR (TNV 75 7741). Složení kultivačního média je uvedeno v Tab. 2-3. Pro potřebu testování je kultivační médium uchováváno při 4 °C a v temnu.

Všechny použité chemikálie byly jakosti p.a. Složení použitého živného média se liší od složení zásobního roztoku živin uváděných v normě ČSN EN

28692. Tento předpis je nevyhovující zejména kvůli nízkému obsahu uhličitánů, jež jsou nezbytné pro dostatečně rychlý růst řasové suspenze (LUKAVSKÝ 1997).

Řasové inokulum pro zkoušku se odebírá z exponenciálně rostoucí kultury, jež se kultivuje v živném médiu ve vzduchem prokysličených 250ml baňkách. Přísun oxidu uhličitého nezbytného pro růst řasové biomasy byl zajištěn probubláváním filtrovaným vzduchem. Inokulační kultura se pěstuje za laboratorní teploty při neustálém osvětlení bílou zářivkou - světelná intenzita od 60 do 120 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (ČSN EN 28692). Přeočkování zásobní kultury se provádí jednou za měsíc.

Exponenciální fázi kultury lze udržovat pravidelnou náhradou části kultury čerstvým médiem, např. 1x denně. Objem měněného média pak určuje průtokovou rychlost a tedy i fázi růstové křivky. Při generační době – zdvojení (LUKAVSKÝ, ústní sdělení).

Při naočkování či přeočkování zásobní kultury řas bylo pracováno ve sterilním prostředí flow-boxu (firma Köttermann), veškeré použité skleněné nádobí bylo před prací sterilizováno v pícce (teplota 350 °C, 30 minut), kultivační baňky byly bezprostředně před použitím sterilizovány 15 minut v autoklávu (teplota 120 °C). Po asi 7-10 dnech od naočkování se inokulační kultura dostane do exponenciální fáze růstu, kdy je vhodná pro testování.

Příprava inokula spočívá ve stanovení hustoty kultury z předkultivace. Pomocí mikroskopu (Lambda DN 45) se v počítací komůrce stanoví hustota kultury z předkultivace. Testovací i kontrolní roztoky se naočkují stejným množstvím řasové suspenze tak, aby po naočkování byla ve všech testovacích i kontrolních kulturách počáteční koncentrace 80 000 řasových buněk v 1 ml inokulační kultury. Zkušební roztoky byly připraveny smícháním odpovídajících objemů zásobních roztoků zkoušené látky, kultivačního média a inokula ve zkušebních nádobách (25 ml Erlenmayerovy baňky). Výsledný objem testovaného roztoku byl ve všech nádobách 25 ml. Kontrolní vzorky byly tvořeny pouze kultivačním médiem a inokulem.

Takto připravené zkušební nádoby se zazátkují polopropustnou buničinou a vloží se do plexisklového inkubátoru, který je umístěn nad bílým zářivkovým světlem. Zazátkované zkušební nádoby se inkubují při teplotě 25 °C za stálého osvětlení bílým zářivkovým světlem (světelná intenzita dle ČSN EN 28692) po dobu 96-ti hodin. Vzhledem ke skutečnosti, že se jednalo o krátkodobé akutní testy toxicity málo živných vzorků, byl do baněk dodáván CO_2 pouhou difúzí, která se vzhledem k nízkému vodnímu sloupci, max. 1 cm, ukázala jako dostatečná. Při dlouhodobějších testech toxicity s živnějšími vzorky je však nutno zajistit syčení vzorků CO_2 , aby nedošlo k jeho vyčerpání a tedy k limitaci růstu kultury.

Pro stanovení hustoty řasových buněk byla použita počítací metoda pomocí mikroskopu s počítací komůrkou. Po homogenizaci vzorku byl odebrán malý objem testovaného roztoku plastovým kapátkem. Měření bylo prováděno

po 24 hodinách. Konduktivita vzorku byla měřena multimetrem (WTW Multiline P4).

Byla testována toxicita Cr(VI) ve formě roztoku $K_2Cr_2O_7$ (připraveného z práškového dichromanu jakosti p.a.) při různých hladinách celkové mineralizace vzorku ($0,006 \text{ mol.l}^{-1}$, $0,031 \text{ mol.l}^{-1}$, $0,056 \text{ mol.l}^{-1}$, $0,082 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,107 \text{ mol.l}^{-1}$). Jednotlivé hladiny celkové mineralizace vzorků byly vytvořeny smíšením vypočtených množství zředovací vody a „přírodní“ směsi solí. „Přírodní“ směs solí svým chemickým složením odpovídá složení umělé mořské vody dle (MORENO-GARRIDO et al. 1998) a je uvedeno v následující tabulce.

Tab. 1: Složení umělé mořské vody (MORENO-GARRIDO et al. 1998)

Tab. 1: Artificial sea water (MORENO-GARRIDO et al. 1998)

Umělá mořská voda		Živný roztok f/2.	
Vzorec soli	Koncentrace (g.l^{-1})	Látka	Koncentrace (mg.l^{-1})
NaCl	23,96	NaNO ₃	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,346	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	11,3
MgCl ₂ .6H ₂ O	6,5	Na ₂ EDTA	4,36
NaBr	1,029	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15
KCl	0,596	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,397	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,027	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,006	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18
NaF	0,0042	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006
Roztok stopových prvků	Koncentrace (ml.l^{-1})	Vitamín B ₁₂	0,005
Živný roztok f/2	1	Vitamín B ₁	0,1

Pro každou zkoušenou koncentraci a kontrolní vzorek se sestojí růstová křivka hustoty řasových buněk v závislosti na čase. Pro určení inhibice (popř. stimulace) růstu řasové kultury byla použita tzv. "integrální metoda", která spočívá ve výpočtu plochy pod růstovou křivkou (integrál biomasy) pro každou testovanou koncentraci a inhibice (popř. stimulace) se stanoví ze srovnání této plochy s plochou pod růstovou křivkou kontrolního vzorku. Takto zjištěná inhibice názorně ukazuje celkový nárůst biomasy.

K výpočtu hodnot EC50 a intervalů spolehlivosti na hladině významnosti 95% byla použita logaritmicko-lineární funkce. Tyto výpočty byly prováděny pomocí počítačového programu TOXICITA. Pro zjištění parametrů NOEC a LOEC byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu na hladině významnosti 95%.

Výsledky

Toxicita $K_2Cr_2O_7$ byla nejprve stanovena pouze ve zředovací vodě (celková mineralizace tohoto vzorku je $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$). Poté byly provedeny testy se vzorky o čtyřech různých hladinách celkové mineralizace ($0,031 \text{ mol.l}^{-1}$, $0,056 \text{ mol.l}^{-1}$, $0,082 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,107 \text{ mol.l}^{-1}$). Byl též proveden akutní test toxicity "přírodní" směsi solí bez přídavku $K_2Cr_2O_7$ pro zjištění "toxického" účinku samotné směsi solí. Všechny testy byly provedeny ve dvou či třech replikacích.

V tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny výsledky akutního testu toxicity $K_2Cr_2O_7$ na *Scenedesmus subspicatus* při nejnižší hladině celkové mineralizace vzorku ($0,006 \text{ mol.l}^{-1}$) bez přídavku „přírodní“ směsi solí.

V další tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny výsledky akutního testu toxicity "přírodní" směsi solí (bez $K_2Cr_2O_7$). Z výsledků tohoto testu byly určeny vhodné hladiny celkové mineralizace vzorků pro provádění testů s $K_2Cr_2O_7$ tak, aby tyto hladiny reprezentovaly vždy určitý úsek inhibiční křivky "přírodní" směsi solí (různý stupeň inhibice).

Tab. 2: Vyhodnocení výsledků testu, $K_2Cr_2O_7$

Tab. 2: Evaluation of the test with $K_2Cr_2O_7$

$K_2Cr_2O_7$	[mg.l ⁻¹]	[μmol.l ⁻¹]
EC5	0,03	0,1
EC50	0,20	0,7
Interval spolehlivosti EC50	(0,14- 0,26)	(0,5-0,9)
NOEC	-	-
LOEC	0,03	0,1

Tab. 3: Vyhodnocení výsledků testu, „přírodní“ směs solí

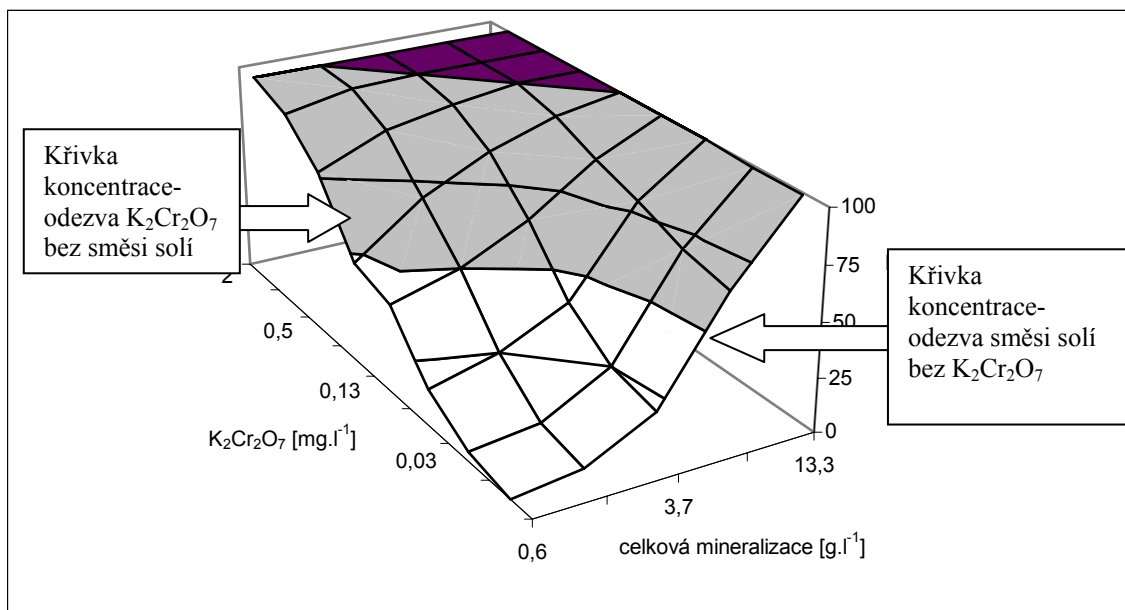
Tab. 3: Evaluation of the test with „natural“ mixture of salts

„přírodní“ směs solí	[g.l ⁻¹]	[mol.l ⁻¹]
EC5	2,25	0,027
EC50	5,21	0,062
Interval spolehlivosti EC50	(4,13-6,29)	(0,049-0,075)
NOEC	1,61	0,019
LOEC	3,21	0,038

Vzhledem k vysoké toxicitě $K_2Cr_2O_7$ (100% inhibici růstu řasových buněk způsobuje již koncentrace $6,8 \text{ μmol.l}^{-1}$) již ve vzorku málo mineralizovaném ($0,006 \text{ mol.l}^{-1}$) lze předpokládat, že u vzorků s vyšší mineralizací by mělo docházet ještě ke zvýšení výsledného toxického efektu $K_2Cr_2O_7$, vzhledem k paralelnímu toxickému působení přítomných solí („přírodní“ směsi solí). Výslednou grafickou závislost inhibice růstu řasových buněk na koncentraci $K_2Cr_2O_7$ a celkové mineralizaci vzorku lze tedy očekávat přibližně následující graf.

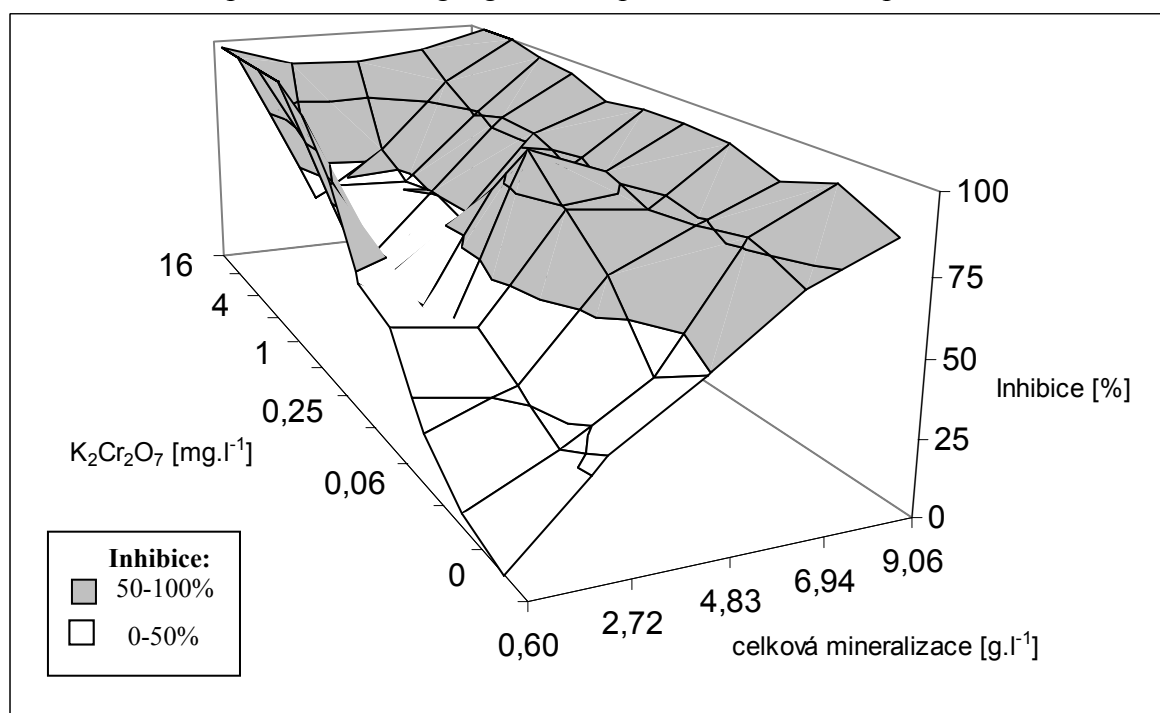
Graf 1: Očekávaný průběh závislosti inhibice růstu řasových buněk na koncentraci $K_2Cr_2O_7$ a celkové mineralizaci vzorku.

Fig 1: Expected relationship between the growth inhibition and salt concentrations



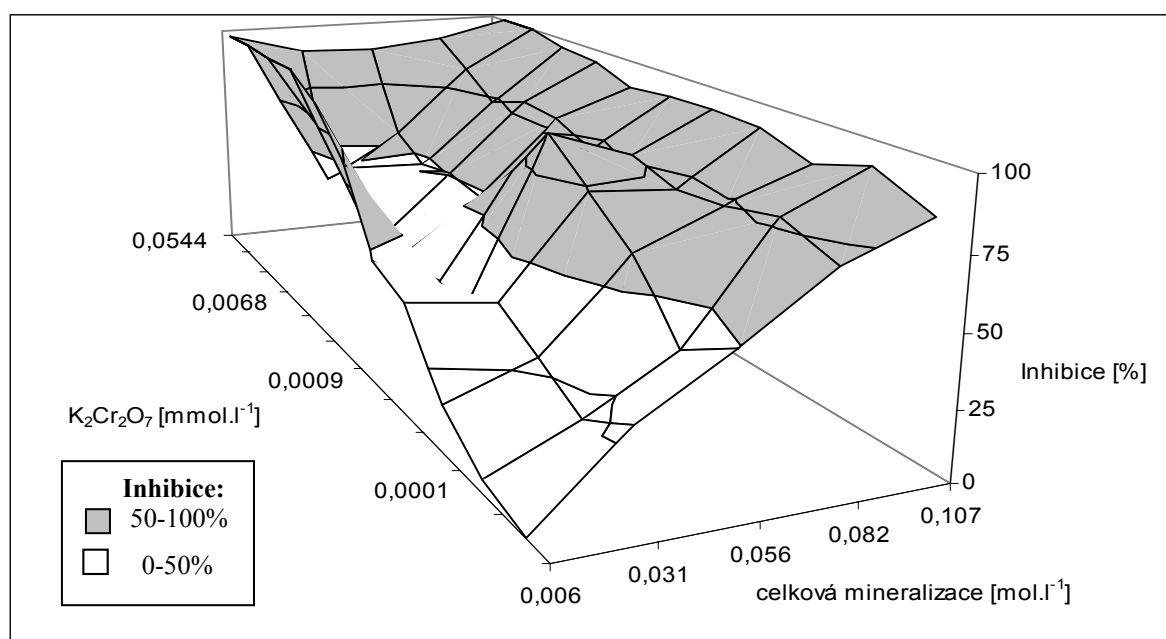
Graf 2: Výsledný graf závislosti odezvy řasové suspenze na přítomnost toxikantu v měnícím se gradientu mineralizace. Hmotnostní vyjádření.

Fig 2: Real relationship between the algal growth response and toxic compound



Graf 3: Výsledný graf závislosti odezvy řasové suspenze na přítomnost toxikantu v měnícím se gradientu mineralizace. Molární vyjádření

Fig. 3: Real relationship between the algal growth response and toxic compound (mmol.l^{-1})



Průběh a výsledky provedených testů se od modelového příkladu značně lišily. Výsledky všech testů jsou pro přehlednost vyjádřeny pomocí prostorových grafů jako závislost inhibice růstu řasových buněk na koncentraci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (hmotnostní, resp. látkové) a celkové mineralizaci (hmotnostní, resp. látkové) vzorku (grafy 2, 3).

Z výsledků experimentů shrnutých v uvedených grafech vyplývají následující závěry. Nelze potvrdit předpoklad aditivního účinku „přírodní“ směsi solí na toxicitu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ vůči sladkovodní řase *Scenedesmus subspicatus*. I při relativně nízké koncentraci „přírodní“ směsi solí dochází k překrytí toxického účinku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Při koncentraci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $6,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$, která způsobuje 100% inhibici růstu řasových buněk ve vzorku bez přídavku „přírodní“ směsi solí (celková mineralizace je $0,006 \text{ mol.l}^{-1}$), dochází u vzorku o celkové mineralizaci $0,031 \text{ mol.l}^{-1}$ k inhibici pouze 22%. Tato hodnota se výrazně neliší od hodnoty inhibice vzorku o stejné mineralizaci, ale bez přídavku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (30%). Obecně lze říci, že pro vzorek o celkové mineralizaci $0,031 \text{ mol.l}^{-1}$ se pohybuje inhibice růstu buněk kolem hodnoty 25% (v intervalu hodnot 19-37%), bez ohledu na množství přidaného $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (v intervalu koncentrací $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ od 0 do $6,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Inhibice růstu se zvyšuje až při koncentraci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $13,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$, kde dosahuje hodnoty 49%. Při koncentraci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $54,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ již dosahuje inhibice růstu řasových buněk hodnoty 91%.

Obdobný jev lze vypořádat i u dalšího testu se vzorkem o celkové mineralizaci $0,082 \text{ mol.l}^{-1}$, resp. $0,107 \text{ mol.l}^{-1}$. Zde je inhibice růstu řasových

buněk v závislosti na koncentraci $K_2Cr_2O_7$ (v intervalu koncentrací $K_2Cr_2O_7$ od 0 do $13,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$) také konstantní a pohybuje se kolem hodnoty 75% (v intervalu hodnot od 71% do 79%), resp. 90% (od 85% do 96%). U vzorku o celkové mineralizaci $0,082 \text{ mol.l}^{-1}$ dochází ke zvýšení inhibice růstu buněk až od koncentrace $K_2Cr_2O_7$ $27,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (inhibice 83%) a pro koncentraci $K_2Cr_2O_7$ $54,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je inhibice již 93%. Vzorek o nejvyšší testované celkové mineralizaci ($0,107 \text{ mol.l}^{-1}$) vykazuje od koncentrace $K_2Cr_2O_7$ $27,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ již 100% inhibici.

Odlišný průběh oproti předcházejícím třem testům vykazoval test se vzorky o celkové mineralizaci $0,056 \text{ mol.l}^{-1}$. V tomto případě inhibice zpočátku stoupá s koncentrací $K_2Cr_2O_7$ ve vzorku od hodnoty 37% (nulová koncentrace $K_2Cr_2O_7$) do hodnoty 88% (koncentrace $0,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$). U vzorků o vyšších koncentracích $K_2Cr_2O_7$ byl ale pozorován pokles inhibice, která se u vzorků o koncentracích $K_2Cr_2O_7$ od $3,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do $27,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ustálila kolem hodnoty 50% (interval hodnot od 47% do 55%). Zde byl již tedy patrný obdobný průběh inhibiční křivky jako při jiných testovaných hladinách mineralizace vzorku. Výraznější inhibice růstu buněk je poté pozorována až při koncentraci $K_2Cr_2O_7$ $54,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy dosahuje hodnoty 89%.

Na základě zjištěných skutečností lze shrnout, že **přídavek „přírodní“ směsi solí ve vzorku překrývá toxický účinek přítomného $K_2Cr_2O_7$, který se výrazněji projeví až od koncentrací $54,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$. Ovšem ani při této koncentraci nevykazují mineralizované vzorky (kromě vzorku o celkové mineralizaci $0,107 \text{ mol.l}^{-1}$) 100% inhibici růstu řasových buněk (hodnota inhibice je kolem 90%).** Pro srovnání je nutné si uvědomit, že 100% inhibici růstu řasových buněk ve vzorku bez přídavku „přírodní“ směsi solí vyvolala již koncentrace $K_2Cr_2O_7$ $6,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$, tedy koncentrace osmkrát nižší.

Diskuse a závěry

Vzhledem ke skutečnosti, že inhibice růstu řasových buněk mineralizovaných vzorků s přídavkem $K_2Cr_2O_7$ (až do hodnoty koncentrace $27,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ $K_2Cr_2O_7$) je prakticky stejná jako u mineralizovaných vzorků bez přídavku $K_2Cr_2O_7$, lze uvažovat, že kromě prostého překrytí toxického účinku $K_2Cr_2O_7$ přítomnými solemi může ve vzorku docházet k určitým chemickým přeměnám, které sníží toxický účinek $K_2Cr_2O_7$. V mineralizovaných vzorcích může docházet vzhledem k poměrně vysoké koncentraci chloridového iontu, který patří mezi silně komplexující ligandy (LATALA & SUROSZ 1998), k „zakomplexování“ dichromanového iontu a tím k podstatnému snížení jeho toxicity. Vzhledem ke skutečnosti, že chrom je v oxidačním stavu VI (na rozdíl od iontu Cr^{3+}) za běžných podmínek poměrně málo komplexující (GREENWOOD & EARNSHAW 1993), je snížení toxicity $K_2Cr_2O_7$ v důsledku tvorby komplexu málo pravděpodobné. Uvažovat můžeme také biosorpci, tedy o adsorpci či

absorpci $K_2Cr_2O_7$ řasovou biomasou, která může vést k následnému snížení obsahu toxického $K_2Cr_2O_7$ ve vzorku. Biosorpce chromu v oxidačním stavu VI byla pozorována např. u řas *Scenedesmus obliquus* nebo *Chlorella vulgaris* (DÖNMEZ et al. 1999). Odpověď na tyto otázky by mohla přinést podrobnější chemická analýza vzorku.

Další možností vysvětlení těchto jevů jsou mechanismy příjmu živin na úrovni buněčné. Reakce organismu na vnější podnět je dána souhrou celé skupiny faktorů prostředí. Styk s vnějším prostředím umožňují buněčné povrchy a každý povrch obsahuje určitý počet vazebných míst, iontových kanálů a různých přenašečů (NÁTR 1998). Reaktivita je tedy dána kapacitou buněčných povrchů. Metodika experimentu toxicity zkoumá vliv toxické substance za současného působení přídatku směsi solí podobných mořské vodě. Tato umělá mořská voda obsahuje poměrně velké množství iontů, zejména sodných a chloridových. Ve výsledku experimentu je patrná určitá odchylka od teoreticky předpokládané reakce na toxickou substanci a zvýšenou salinitu. Obecně lze říci, že jakýkoli nadlimitní faktor může způsobit organismu stres a vyvolat stresovou reakci. V našem případě vyvolávají stres ionty Na^+ , Cl^- , $Cr_2O_7^{2-}$, které jsou v nadbytku s různým poměrem. Za minimální celkové mineralizace je patrný vliv $K_2Cr_2O_7$. Se zvyšující se koncentrací dochází ke zvyšování inhibice růstu testovaných kmenů. Na rozdíl od očekávaného vývoje inhibice dochází zde však k určité prodlevě a posunu větší inhibice k vyšším koncentracím $K_2Cr_2O_7$. Zvýšená koncentrace dichromanu zřejmě vyvolává standardní stresovou reakci buněk, tj. tvorba stresových proteinů a fytochelatinů, které mají za úkol ochránit buněčný enzymatický aparát (GLOSER & PRÁŠIL 1998). Biogenní prvky potřebují k inhibici růstu přibližně tisíckrát větší koncentraci než testovaná látka. V grafu experimentu je patrný efekt kompetice iontů $Cr_2O_7^{2-}$ a iontů umělé mořské vody o iontové kanály a proteinové přenašeče. Díky značné převaze iontů umělé mořské vody lze předpokládat, že budou mnohem úspěšnější v kompetici o tyto vstupní buněčné otvory. Dalším faktorem, který může zvýhodnit drobné ionty umělé mořské vody je poměrně větší objem testované toxické částice. Celou tuto kompetici můžeme vnímat jako údolí, které se v grafu vytvořilo v oblasti celkové mineralizace $2,72\text{ g.l}^{-1}$. Znamená to tedy, že i při zvyšující se koncentraci testované substance je kultura spíše pod vlivem drobných iontů umělé mořské vody. Životnost buněk v tomto stavu závisí na jejich metabolických rezervách, které jim dovolí aktivně odčerpávat nadbytečné ionty pomocí různých ATP-ázových pump. Zvýšená mineralizace matrice vzorku maskuje přítomnost „skutečně“ toxické anorganické sloučeniny ($K_2Cr_2O_7$). Sladkovodní řasa *Scenedesmus subspicatus* vykazuje inhibiční chování v důsledku přítomných solí a výsledek takto provedeného testu nemusí poskytnout vhodnou informaci o přítomnosti a koncentraci toxických látek. Vysoce toxické látky přitom mohou být přítomny ve vzorku i v relativně vysokých koncentracích, které by u vzorků o nízké mineralizaci vyvolaly 100% inhibici růstu buněk. V praxi pak může výsledek takto provedeného testu vést

k chybným závěrům, např. při stanovení ekotoxicity vodného výluhu odpadu a jeho následného zařazení dle Kategorizace a katalogu odpadů (ŠVAGR et al. 2001).

Pro výše uvedené důvody lze považovat použitelnost sladkovodní řasy *Scenedesmus subspicatus* jako testovacího organismu pro stanovení ekotoxicity mineralizovaných vzorků jako zcela nevyhovující. Nabízí se aplikace řas s větší ekologickou valencí vůči přítomnosti solí. Lze doporučit otestování citlivosti mořských druhů řas na mineralizované vzorky. Tyto organismy pravděpodobně nebudou vykazovat stresové chování ve vzorcích o vyšší mineralizaci (průměrná hodnota celkové mineralizace mořské vody se pohybuje kolem 35g.l^{-1} ; PITTER 1990), ale naopak v prostředí s nižším obsahem rozpuštěných solí mohou vykazovat inhibici růstu buněk v důsledku absence potřebného množství solí. Na základě experimentálních stanovení by bylo praktické určit vhodné rozpětí mineralizace vzorku, ve kterém by mořské druhy řas mohly sloužit jako standard (ŠVAGR et al. 2001). K dispozici jsou např. *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana* či *Skeletonema costatum*. (KOČÍ 2001).

Zajímavé by bylo zkusit aplikovat pro testy toxicity mineralizovaných vzorků některé druhy řasy vyskytující se v brakických vodách. Tyto druhy totiž vykazují poměrně vysokou schopnost přizpůsobovat se kolísavým podmínkám růstu a vzhledem k této vlastnosti by mohli sloužit jako dobrý univerzální testovací organismus (LYTLE & LYTLE 2001). Jejich použití při testech toxicity není zatím běžné.

Další dnes již běžně užívaný testovací rod řasy *Chlorella* vykazuje údajně velkou toleranci k salinitě. Byly pokusy (úspěšné) pěstovat tuto řasu ve velkém ve zředěné mořské vodě. I toto by bylo slibné téma pro další práce (LUKAŤSKÝ, ústní sdělení).

Poděkování

Práce byla realizována za podpory projektu GA ČR: GA203/00/D014.

Literatura

- ČSN EN 28692 (1995): Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenostrum capricornutum*. – ČNI, Praha.
- DÖNMEZ, G. C., AKSU, Z., ÖZTÜRK, A. & KUTSAL, T. (1999): A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. – *Process Biochemistry* 34: 885–892.
- GLOSER, J. & PRÁŠIL, I. (1998): Stres rostlin. – In: PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J. (eds): *Fyziologie rostlin*, 484 pp., Academia, Praha.
- GREENWOOD, N. N. & EARNSHAW, A. (1993): *Chemie prvků*. – 1635 pp., Informatorium, Praha 1993.

- KOČÍ, V. (2001): Metody ekotoxikologické analýzy vhodné pro bioremediaci. – In: Sanační technologie IV, Sborník konference, Seč. p. 1– 5.
- LATALA, A. & SUROSZ, W. (1998): The effect of salinity on toxic influence of heavy metals towards planktonic green algae. – *Biologia* 4 (53): 547– 555.
- LUKAVSKÝ, J. (1997): Problematika řasových testů podle ISO a OECD. – In: VYKUSOVÁ, B., SVOBODOVÁ, Z. & KOLÁŘOVÁ, J. (eds.): Sborník referátů konf. „Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním hospodářství“, VÚRH JČU Vodňany, p. 16– 21.
- LYTLE, J. S., & LYTLE, T. F. (2001): Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. – *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 68– 83.
- MOHAPATRA, P. K., DASH, R. C., PANDA, S. S., MISHRA, R. K. & MOHANTY, R. C. (1998): Effects of Nutrients at Different Salinities on Growth of the Freshwater Green Alga *Scenedesmus bijugatus* in Water of Narendra Pond, Puri, Orissa. – *Internat. Rev. Hydrobiol.* 4 (83): 297– 304.
- MORENO–GARRIDO, I., LUBIÁN, L. M. & SOARES, A. M. V. M. (1998): In vitro population of rotifer *Brachionas plicatilis* show inhibition when fed with copper pre- accumulating microalgae. – *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9: 220– 225.
- NÁTR, L.: Minerální výživa. – In: PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J. (eds): *Fyziologie rostlin*, 484 pp., Academia, Praha.
- PITTER, P. (1990): *Hydrochemie*. – 568 pp., SNTL, Praha.
- ŠVAGR, A., KOČÍ, V. & RAKOVICKÝ, T. (2001) Řasové testy toxicity na salinních vzorcích. – *Czech Phycology* 2: 107– 114.
- TNV 75 7741 (1997): Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem. – Hydroprojekt a.s., Praha.